



临床细菌室厌氧菌培养基本程序

张秀珍

内容

- 厌氧培养基本设备
- 厌氧标本采集和运送步骤
- 厌氧菌的分离和鉴定步骤
- 厌氧菌的报告
- 厌氧菌的药敏试验
- 厌氧菌的菌种保存



厌氧培养基本设备

厌氧菌培养的基本条件及设备

设备	北京医院细菌室采用方式		生产厂商
床边采样设备	厌氧袋试验合，内含气体发生器及指示剂共20套(45534)		法国生物梅里埃
输送培养基	Amies输送琼脂(41998、41999) 难辨梭菌琼脂(43213)		法国生物梅里埃
常规准备培养基	厌氧血琼脂或 斯氏琼脂+5%羊血(43273) 斯氏万古霉素+5%羊血(43223)		自制或法国生物梅里埃
厌氧气袋	厌氧气体发生器 10个/盒(96121)		法国生物梅里埃
厌氧盒或厌氧罐	5~10个	厌氧盒(96127): 厌氧罐:	法国生物梅里埃 英国OXOID公司 法国生物梅里埃

厌氧培养的培养基

- 初代接种厌氧菌最好使用新配制的培养基。平板培养基无需在厌氧条件下贮存，用前可进行预还原，但厌氧条件下贮存可延长培养基的有效期。
- 实验室常规准备厌氧培养分离的培养基是厌氧血琼脂。

必备厌氧培养用培养基

- 斯氏琼脂+5%羊血：适用所有厌氧菌生长
- 斯氏万古霉素+5%羊血：适用革兰阴性厌氧菌的分离
- 难辨梭菌选择培养基(CCFA)：分离难辨梭菌
- 改良厌氧血平皿

改良厌氧血平皿配制

- 成分：血琼脂基础按配方
- 半胱氨酸：**0.4克**
- 氯化血红素(**5mg/ml**): **1ml**
- 1%维生素K1: **0.1ml**
- 配制方法:上述各成分混合，加热溶解冷却后调整**pH7.4**。高压灭菌后冷却至**50℃**时加入**5-10%**的脱纤维羊血，混合后倾注平皿。
- 用途：营养好可供大多数厌氧菌生长
- 质量控制：产黑色素普雷沃菌形成典型菌落和色素；产气荚膜梭菌有双圈溶血。

几种重要的厌氧选择培养基

- 卡那霉素、万古霉素溶血平板 (KVB): 类杆菌属, 特别是脆弱类杆菌和产黑色素拟杆菌、
- 卡那霉素胆盐七叶苷平皿 (BBE): 脆弱类杆菌
- 环丝氨酸、先锋克西叮、果糖、蛋黄平皿 (CCFA): 难辨梭菌

提供厌氧环境方法：

- 使用厌氧罐+换气法、
- 厌氧罐+产气袋法
- 厌氧袋+产气袋法
- 厌氧手套箱法。
- 配指示剂

厌氧培养装置

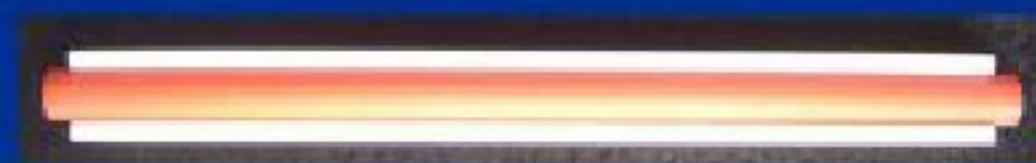
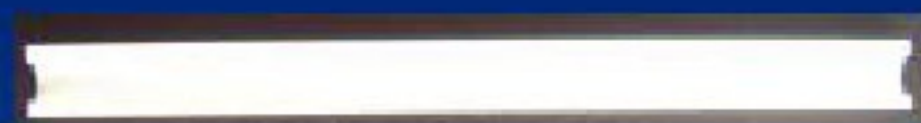
- 厌氧手套箱：价格昂贵、操作时间长、气体消耗大、不易推广
- 厌氧盒+厌氧气袋：应用最普遍、简便
或厌氧罐+厌氧气袋：方便实用
- 厌氧罐抽气换气法：需配置抽气换气装置
- 第二代厌氧气体发生剂不需加水、不需触酶

厌氧培养装置

- ❧ 厌氧盒+厌氧气袋或厌氧罐+厌氧气袋：方便实用
 - ❧ 应用最普遍、简便
- ❧ 厌氧罐抽气换气法：需配置抽气换气装置
- ❧ 厌氧手套箱：较昂贵



所需材料



密封装置



厌氧产气袋



效果图



密封袋

API法

24-48小时内鉴定厌氧菌





厌氧标本的选择、采集和运送

可疑厌氧菌感染特征

- 感染局部产生气体
- 分泌物有恶臭
- 分泌物带血或呈黑色
- 粘膜周围的感染，如肛周、口腔、鼻窦、咽颊等
- 细菌培养阴性，但有菌血症表现
- 长期使用氨基糖苷类抗生素，但无效者
- 有基础疾病免疫低下者

需做厌氧血培养的高危人群

- 肠脓毒症、女性生殖道感染、褥疮及呼吸道感染患者
- ICU患者或近期做过腹部外科手术的患者
- 严重烧伤和外伤患者
- 伴有严重心血管疾病、糖尿病、恶性肿瘤、移植和免疫抑制患者
- 老年患者
- 临床高度怀疑有厌氧菌感染的患者

绝大多数住院患者需要做厌氧血培养

1.正确地选择标本

- 下列细菌学指征有助于选择标本做厌氧培养：
 - (1) 深部伤口或软组织脓肿的脓，特别是伴有恶臭或含有硫磺颗粒时。
 - (2) 可疑为气性坏疽或少见的严重产气或坏死性感染所取得的坏死组织或病灶清除材料。
 - (3) 粘膜部位的感染灶取得的材料。
 - (4) 从脑、肺、肝或其他器官的脓肿或从腹腔内、肛周、膈下或其他部位的脓肿取得的材料。

- (5) 无菌区感染灶的吸出液(包括血液、脑脊液、腹水、胸水、滑膜液、羊水等)。
- (6) 人或动物咬伤感染灶取得的材料。
- (7) 变黑的或置于紫外线发红色荧光的渗出物。
- (8) 革兰染色，镜下见到具有厌氧菌独特形态的材料。
- (9) 可疑引起肉毒杆菌食物中毒的食物。

2.正确地收集标本

- 不能做厌氧培养的标本：
 - (1) 咽、鼻、尿道或直肠拭子。
- (2) 咳出的痰，通过支气管镜取的分泌物，排出或导出的尿、粪及胃内容物。

可做厌氧培养的标本

- **(1)** 从未开放的脓肿抽取脓液。
- (2)** 通过胸腔穿刺抽出的胸腔液。
- (3)** 从耻骨联合上方做膀胱穿刺吸出或从肾造口管收集的尿。
- (4)** 气管切开吸取的肺分泌物。
- (5)** 女性生殖器：后穹隆穿刺。

- 
- **(6) 穿刺抽出的腹腔液。**
 - (7) 通过腰椎穿刺抽出的脑脊液。**
 - (8) 窦道标本可插入小导管用注射器吸出，注射器和针头内的气体应全部排出，将其内容物直接注入一个已排出气的无菌试管内。也可自窦道损伤部位取材做活组织检查。**

3.床边采集标本的步骤

- 1.除去表面陈旧的脓和分泌物,从深处吸出或刮取标本.
- 2.首先接种在厌氧培养基,立即置厌氧盒或厌氧罐内,同时撕开并放入产气袋,放指示剂,立即盖好盖或封好厌氧袋口.
- 3.剩余部分标本种需氧培养基
- 4.剩余最后标本作涂片两张
- 5到达实验室后, 将已接种需氧和厌氧的培养皿置**35度**培养

4.血液以外无菌体液接种

- 胆汁、胸腹水、脑脊液等无菌体液：
- 按比例直接种入厌氧血培养瓶中
- 抽取标本种入厌氧增菌培养基，同时接种厌氧血平皿，全部放厌氧罐，立即放入厌氧产气袋并立即盖好盖，放**35度培养48h**。

5.不能立即接种的厌氧标本

- 1.由主管医生采集,必须深部新分泌物
- 2.采集后立即放入运送培养基
- 3.24h内送到实验室

标本采样及运送

- ❧ 首选：床边采样直接从病变部位取材后接种入相应培养基
- ❧ 肺部标本：不与外界接触、不经过上呼吸道
- ❧ 胸腔：胸腔穿刺
- ❧ 尿道：膀胱穿刺
- ❧ 脓肿：注射器穿刺
- ❧ 女性生殖器：后穹隆穿刺
- ❧ 伤口脓：伤口深部标本或骨坏死处标本



- 注：1、采样后如不能直接接种培养基，必须先种入运送培养基。
- 2、痰、支气管镜采样、咽拭子、排出的尿及阴拭子均不适用厌氧菌培养
- 3、粪便只能用于难辨梭菌和肉毒杆菌培养

厌氧标本采集的方法

- 带着厌氧产气袋和厌氧袋或厌氧罐到床边采集标本
- 无菌体液如胸腹水、胆汁和血均可注入自动血培养系统的厌氧培养瓶。
- 不能立即接种的标本应采用输送培养基，可保存厌氧菌24-48h

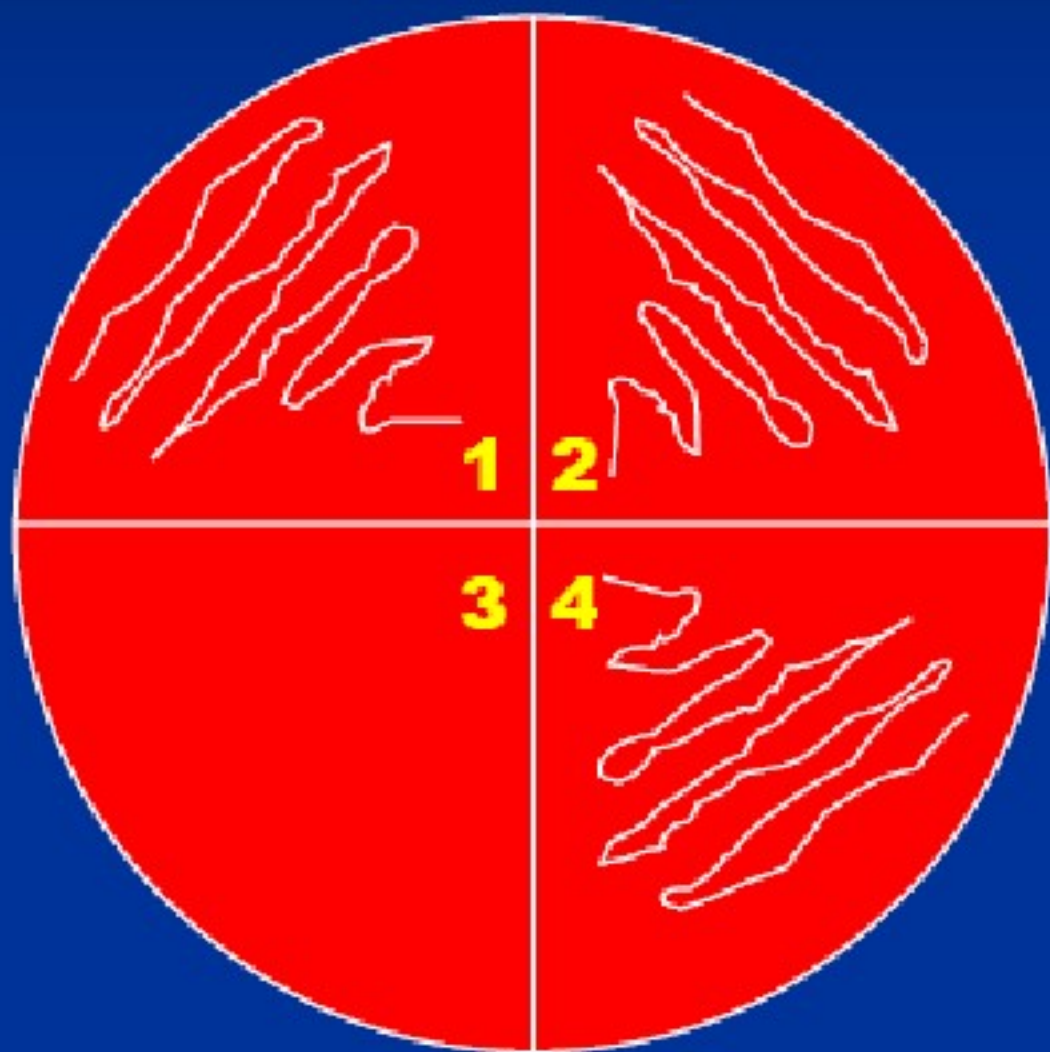


厌氧标本的分离和鉴定

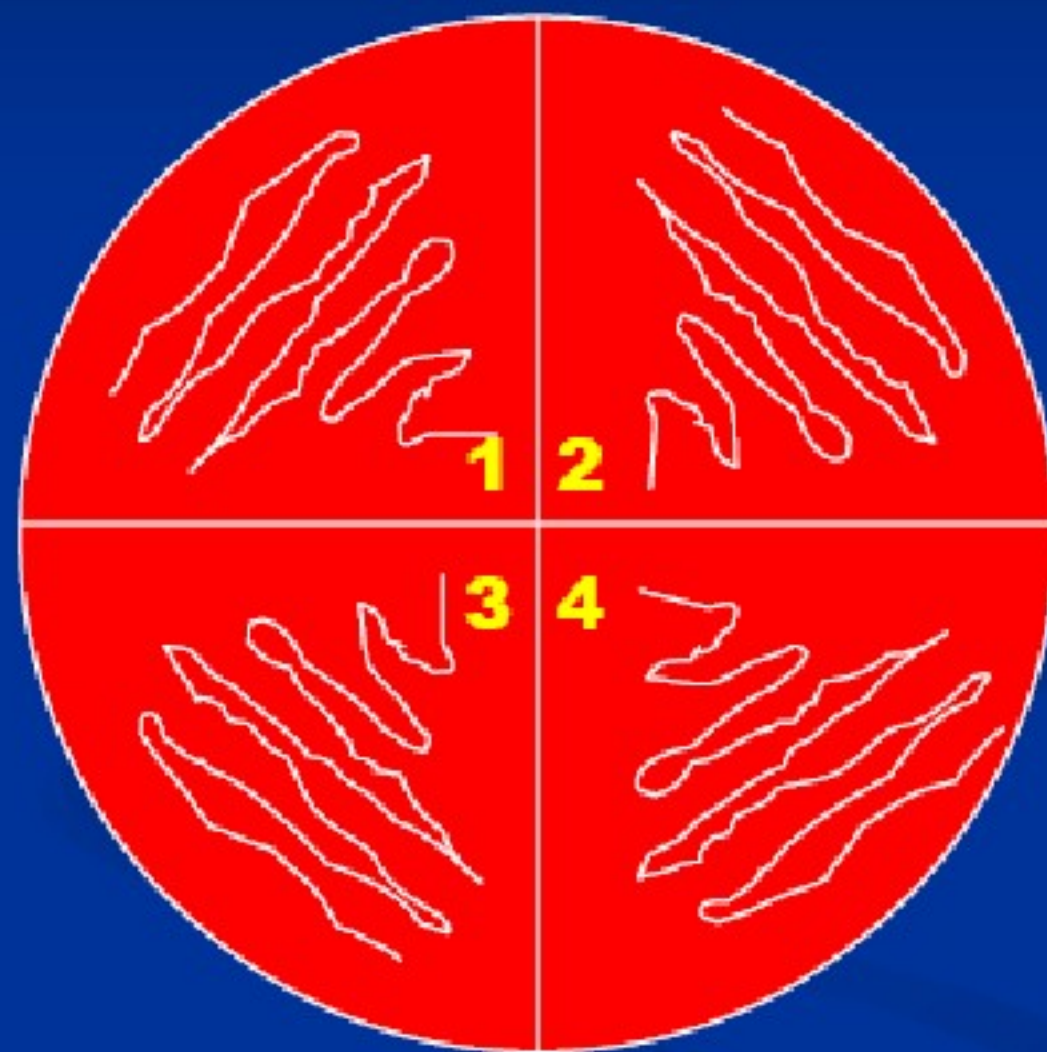
厌氧菌分离的基本分离步骤

- 第一次耐氧试验:
- 初始标本需氧和厌氧对照,发现可疑菌落(需氧环境不生长菌落)
- 第二次耐氧试验:
- 多个可疑菌落分别接种需氧和厌氧平皿,分别置**35度**作需氧和厌氧培养.
- 第三次耐氧试验:
- 取仅厌氧环境生长菌落分别在**35度**厌氧和需氧环境培养,如分离的菌落仅在厌氧环境生长,可确定该菌为厌氧菌.

耐氧试验



需氧培养



厌氧培养

重要的一点

- 做耐氧试验时，原始平皿不要丢弃，继续厌氧培养。主要基于以下考虑：
 - 某些厌氧菌生长较缓慢
 - 一旦厌氧试验失败（由于操作失误），原始平皿上有备份菌株。

原始平皿

耐氧试验平皿



厌氧菌的鉴定步骤和方法

- 耐氧试验:3-4次耐氧试验
- 涂片革兰染色
- 生物特征:API 20A;Ripid 32; VITEK-32
ANI
- 色谱分析
- 分子生物学

直接涂片检查

- 当有足够的标本或收到两个拭子时，最好在接种前做涂片革兰染色镜检，检查结果可提示需要接种哪些培养基（非常规使用的）。涂片检查可看出有无细菌，微生物的类型和大概的数量以及芽胞、形状和位置（芽胞梭菌）、着色情况及菌体特征。对血性液体或浓稠分泌物用丫啶橙染色比革兰染色较易观察。这些初步结果应该及时向主管医生报告，以帮助他们正确选用抗菌药物。涂片检查可核对培养结果是实验室质量控制的一个重要指标。

Www.Microbiohome.Com



Www.Microbiohome.Com



脆弱类杆菌



革兰染色涂片

B B E 寒天培地脆弱类杆菌



血平板形态

产气荚膜梭菌 (*C. perfringens*)

生物学性状

- 形态染色：菌体粗大，两端平截的革兰阳性杆菌。芽胞椭圆形，位于次极端。有明显荚膜。

培养特点：

- 专性厌氧
- 血平板上多数菌株有双层溶血环，内环是由 θ 毒素引起的较窄的透明溶血环，外环是由 α 毒素引起的不完全溶血环。
- 在牛乳培养基中生长时，发酵乳糖产酸，使牛奶中酪蛋白凝固，同时产生大量气体，将凝固的酪蛋白冲碎，并将封闭的凡士林层顶开，冲至试管口，称“汹涌发酵”。

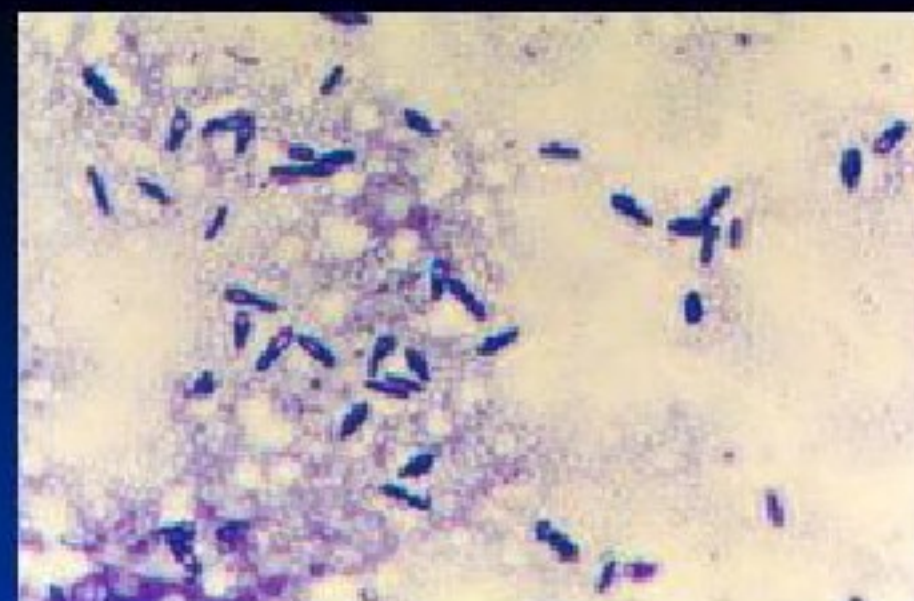


图6-2 产气荚膜梭菌芽胞 (×2000)



图6-3 产气荚膜梭菌荚膜 (×2000)

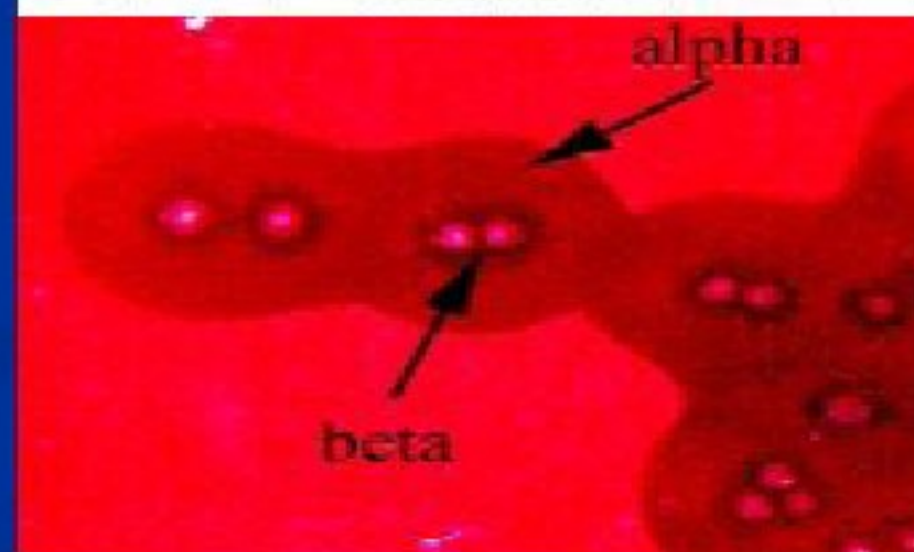
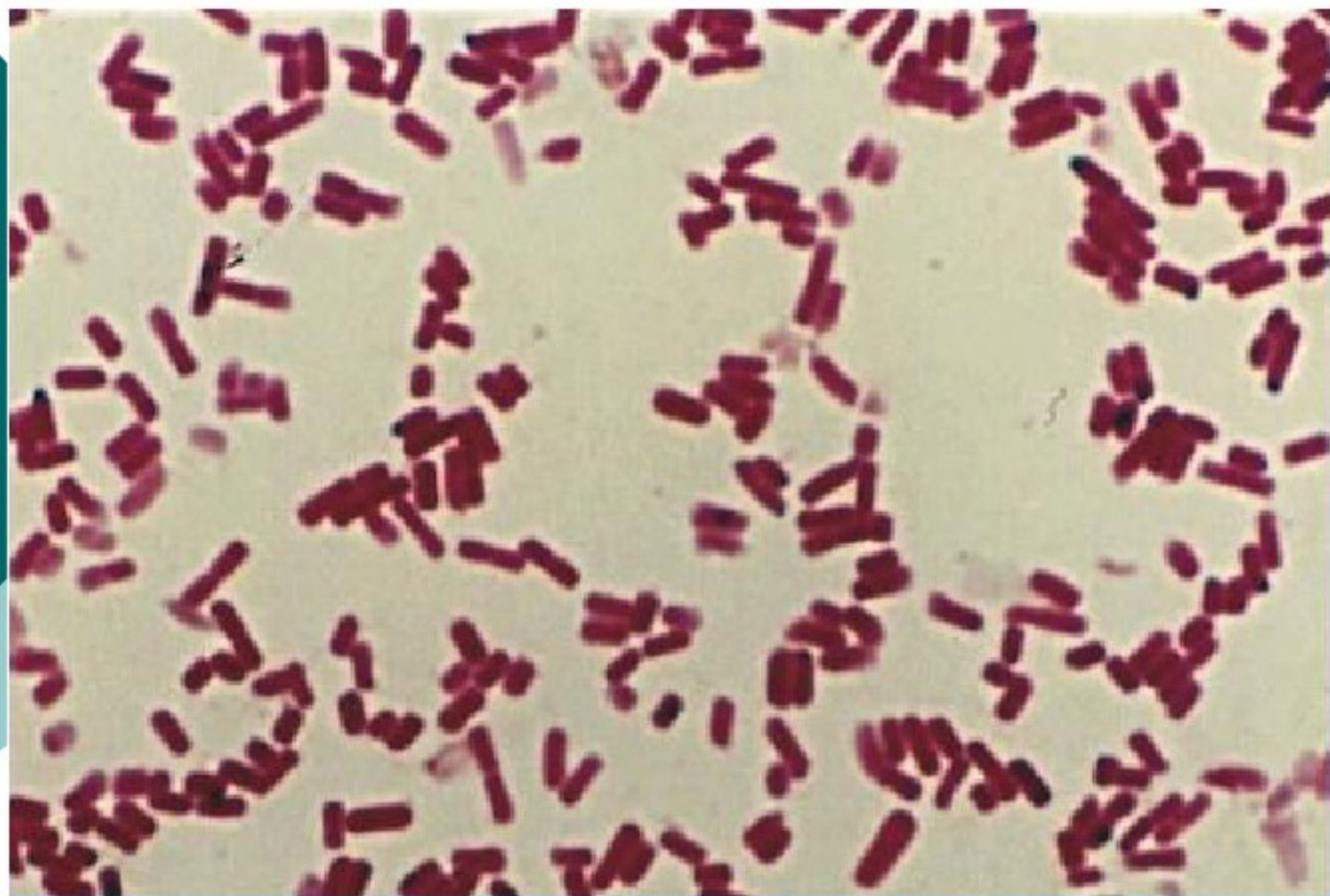


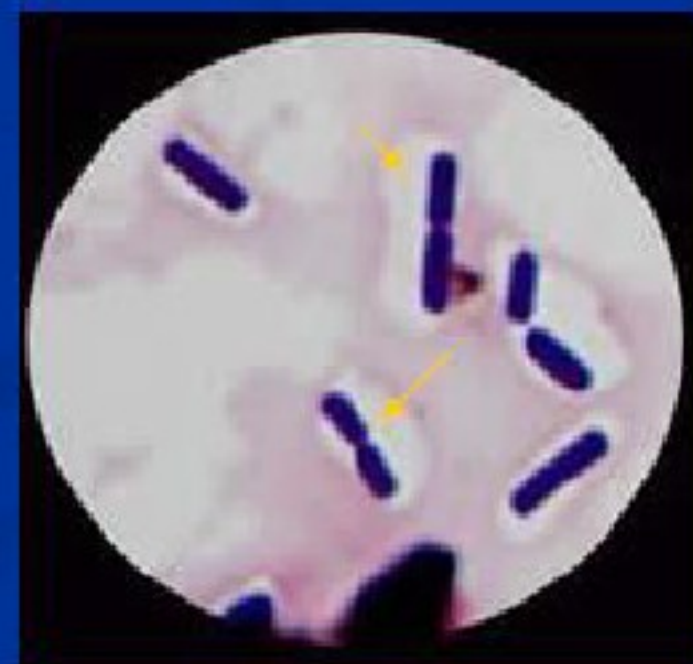
图6-4 产气荚膜梭菌双层溶血环菌落



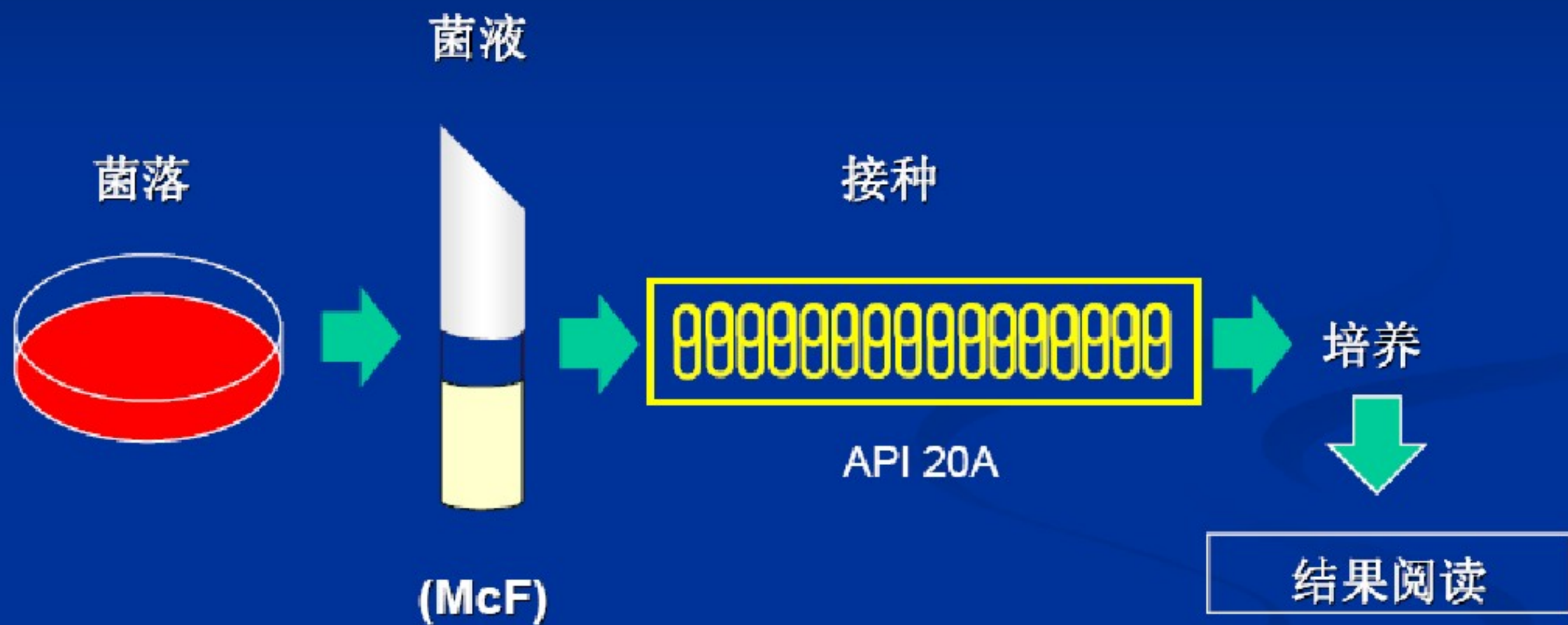
产气荚膜梭菌荚膜(体内易形成):

产气荚膜梭菌(*C.perfringens*)革兰染色涂片:

菌体粗大，两端几乎平切。芽胞呈椭圆形，位于次极端，不大于菌体，体外很少形成芽胞。



一般操作方法



API法

24-48小时内鉴定厌氧菌



API 20 A

数据库3.0版本



● 细菌数: 55种

- 拟杆菌属	(8)		
- 普雷沃菌属	(4)		
- 卟啉单胞菌属	(2)		
- 韦荣球菌属	(1)		
- 葡萄球菌属	(1)		
- 消化链球菌属	(2)		
- 链球菌属	(2)		
- 孪生球菌属	(1)		
		- 梭菌属	(16)
		- 丙酸杆菌属	(3)
		- 双歧杆菌属	(2)
		- 乳杆菌属	(2)
		- 真杆菌属	(3)
		- 放线菌属	(5)
		- 梭杆菌属	(3)

➔ 所有厌氧菌: 杆菌(+), 杆菌(-), 球菌(+), 球菌 (-)

API 20A试条



厌氧菌鉴定依据

根据菌体形态、染色反应、菌落性状以及对某些抗生素的敏感性等作出初步鉴定。最后鉴定是一系列生化及终末代谢产物。

1. 形态与染色 仅供参考，因不同培养基，不同菌龄其形态与染色性不同，厌氧培养时间往往较长，因有的 G^+ 变为 G^- 。

2. 菌落性状 不同厌氧菌菌落形状和性质不同，梭菌的菌落特点是形状不规则，而无芽胞厌氧菌多呈单个的圆形小菌落。



(1) **色素**: 产黑色素普鲁沃菌培养2~10天可产生黑褐色或黑色色素, 龋齿放线菌培养3~4天后产生粉红色色素, 奈氏放线菌延长培养时间可产生黄褐色色素。

(2) **溶血**: 产气荚膜梭菌在新鲜血平板上可形成双溶血圈, 但同种的菌不同株则往往产生溶血性的差异, 各细菌产生的溶血毒素不同, 对不同动物红细胞溶解亦有差异。

(3) **荧光**: 产黑色素普鲁沃菌, 菌落在紫外线照射下, 发出砖红色荧光, 梭杆菌常发生黄绿色荧光, 艰难杆菌发生绿色荧光。

3. 耐氧试验 厌氧菌必须做耐氧试验



4. 药物鉴定试验 大多数类杆菌对卡那霉素耐药，梭杆菌属敏感，厌氧菌对灭滴灵敏感，非厌氧菌耐药。

5. 聚茴香脑磺酸钠（SPS）敏感试验 厌氧消化链球菌对50g/L的SPS溶液敏感，而绝大多数其它G⁺球菌耐药

6. 生化特性 主要包括多种糖类发酵试验、吲哚试验、硝酸盐还原试验、触酶试验、卵磷脂酶试验、脂肪酶试验、蛋白溶解试验、明胶液化试验、胆汁内肉汤生长试验、硫化氢试验，其方法多种多样。



——7. 气液相色谱 气液相色谱技术（GLC）——
是一种以气体或液体为流动相，以涂固定液的载体为固定相。采用冲洗法的柱色谱分离技术。目前用来分析细菌终末代谢产物，结果可靠。

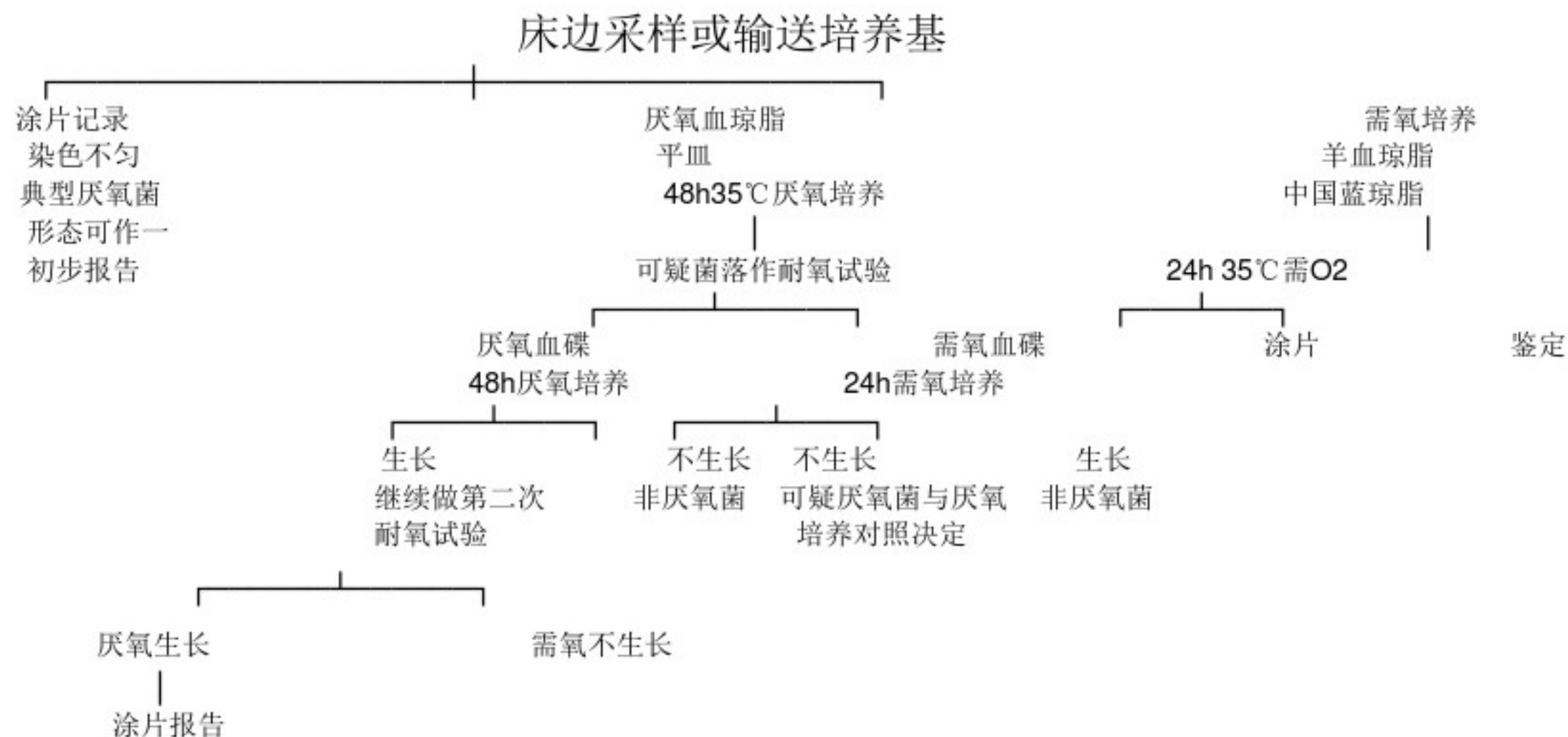
8. PCR、基因探针。



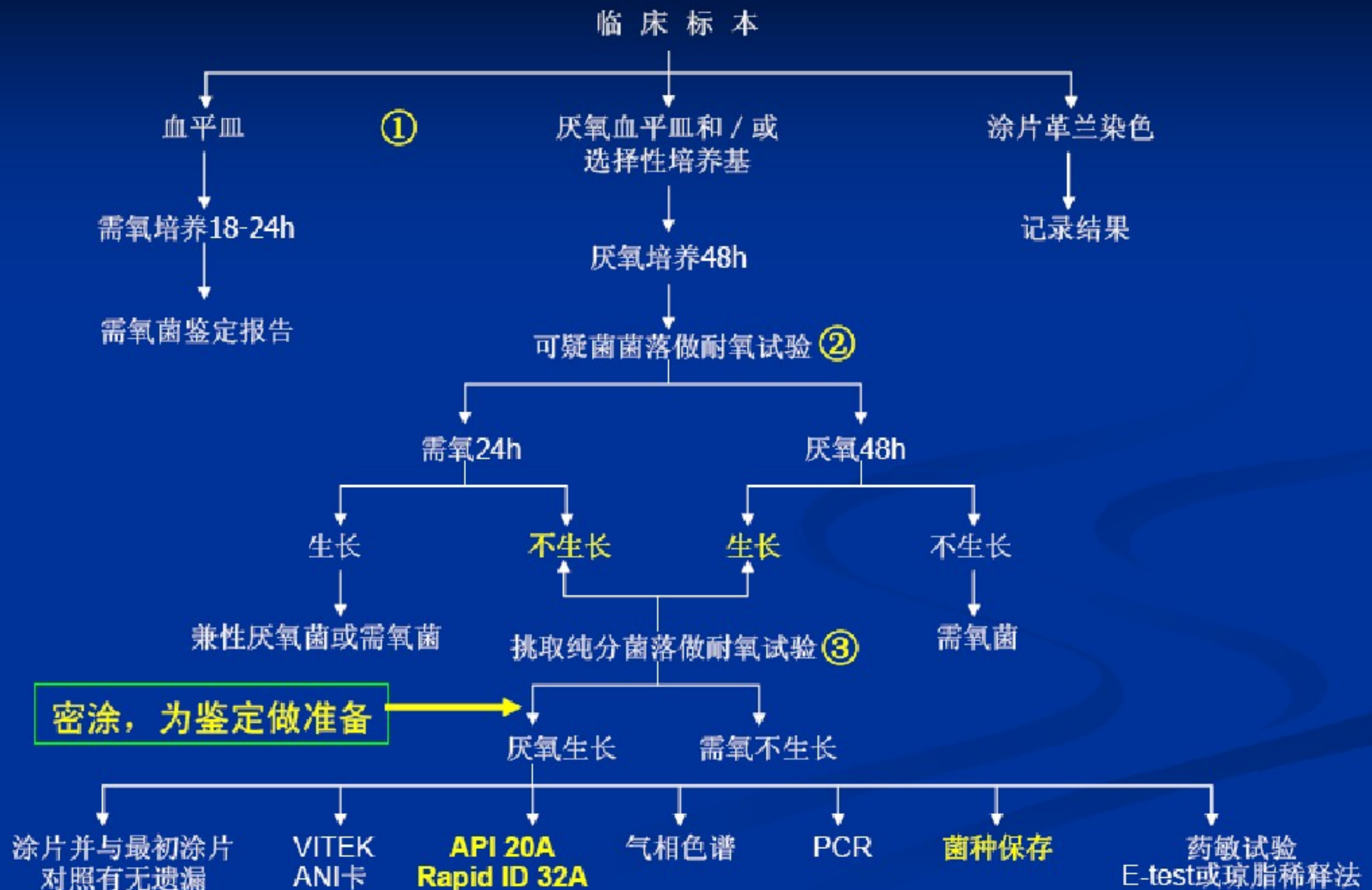
厌氧菌的鉴定

- I级实验室应达到的标准：
根据耐氧试验结果，革兰染色，菌落特点提供厌氧菌初步推断报告。
- II级实验室应达到的标准：
根据革兰染色反应，镜下形态，菌落形态，耐氧试验，用自制或国产传统生化反应试剂定种。
- III级实验室应达到的标准：
除II级实验室所选择的鉴定方法外，能采用国际公认标准化鉴定系统。如API-20A、Micro ID、Vitek-ANI，气--液相色谱仪。

简单步骤 (适用无条件作鉴定单位)



厌氧菌分离鉴定流程



报告方式

- 无条件作生物特征鉴定的实验室：
- 在三次耐氧试验证明菌株只能在厌氧生长者可用下面方式报告。
- 如革兰阴性厌氧球菌；革兰阳性有芽胞杆菌，芽胞呈鼓捶状；
- 有条件实验室应将细菌鉴定到种
- 报告到种

9.厌氧菌的药敏试验

- 厌氧菌感染以经验用药为主：
 - * 厌氧菌对现已上市的药物的敏感性有合理的预测性
 - * 药敏试验报告时间太长（4~6天）
- 厌氧菌药敏试验指征：
 - * 严重感染，如心内膜炎、脑脓肿、骨髓炎治疗时期长，观察药物敏感性变化。
 - * 经验用药无效
 - * 对新药评价
 - * 耐药监测

目前可推荐的厌氧菌药敏方法

- 琼脂稀释法
- Etest法
- ATB-ANA试条

质控菌株MIC范围

抗生素	MIC范围 (μg/ml)		
	脆弱类杆菌 ATCC25285	多形类杆菌 ATCC29741	产气荚膜杆菌 ATCC13124
阿莫西林/棒酸	0.25~1	0.5~2	-----
氨苄西林/舒巴坦	0.5~2	0.5~2	-----
头孢西丁	8~32	32~128	-----
头孢替坦	4~16	32~128	-----
头孢噻污	8~32	16~64	0.06~0.25
头孢曲松	32~128	64~256	-----
氯林可霉素	0.5~2	2~8	0.03~0.12
灭滴灵	0.25~1	0.5~2	0.12~0.5
氯霉素	2~8	4~16	2~8
亚胺培南	0.03~0.12	0.06~0.25	0.03~0.12

菌种保存技术要点：

- （1）对需要长期保存的菌种，采用脱脂牛奶冷冻干燥方法进行保存，其复溶效果及细菌存活率较用肉汤、血浆等附形物要好；
- （2）对中短期保存的菌种，根据菌种的不同采用脱脂牛奶、血浆、全血、**10%**甘油、滤纸片、半固体琼脂培养基及琼脂平板传代等方法进行保存；
- （3）菌种保存温度的选择，根据不同菌种选用室温石蜡覆盖法、室温厌氧湿盒法、**2℃~8℃**、**-30℃~-80℃**冷藏保存等不同的条件进行保存。

参考菌株保存方法

- | | |
|--------|--------|
| ○ 高层琼脂 | 非苛养菌 |
| ○ 琼脂斜面 | 现用菌株 |
| ○ 低温速冻 | 苛养细菌 |
| ○ 冷冻干燥 | 长期保留菌株 |

1. 短期保存菌种：

- 一般细菌可采用半固体过夜培养覆盖石蜡油（**1cm**厚）后，于4℃保存（假单胞菌于室温保存），如有微生物自动鉴定仪可将鉴定卡片放低温冰箱保存。苛养性细菌和厌氧菌，可采用平皿传代的方法保存。

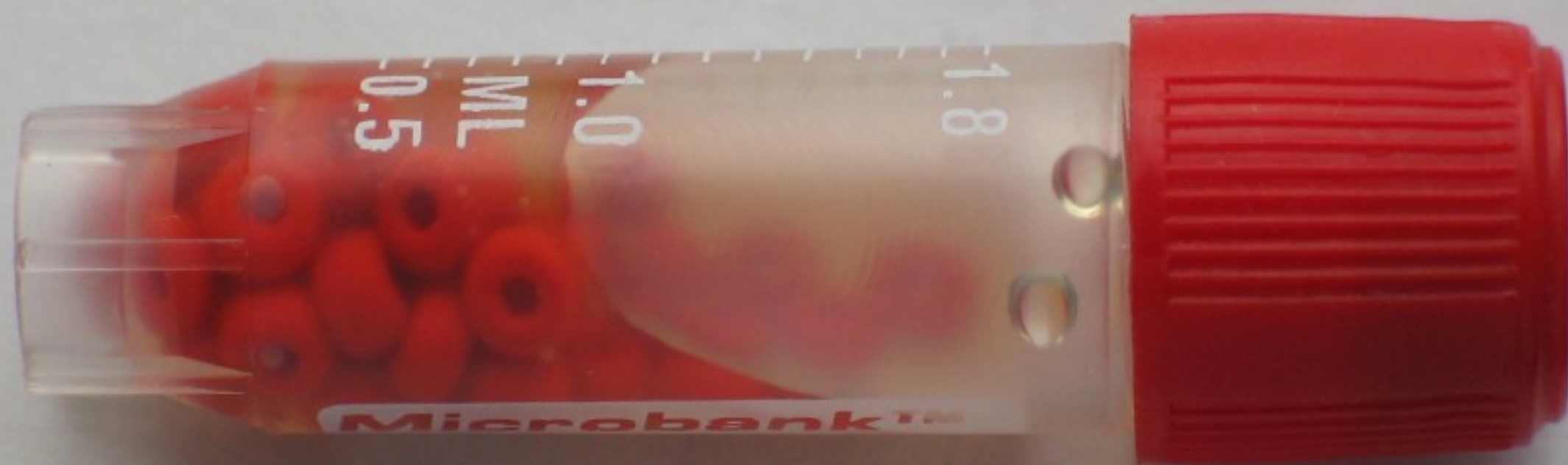
2. 长期保存菌种：

- 冷冻干燥是长期保存细菌最好的方法。不常用的细菌最好冻干保存。经常或定期使用的（有传代限制的）菌种，应采用多支分装低温冷冻保存，载体可根据条件进行选择（脱脂牛奶、血浆、全血、**10%**甘油、滤纸片等）。

3.厌氧菌的保存

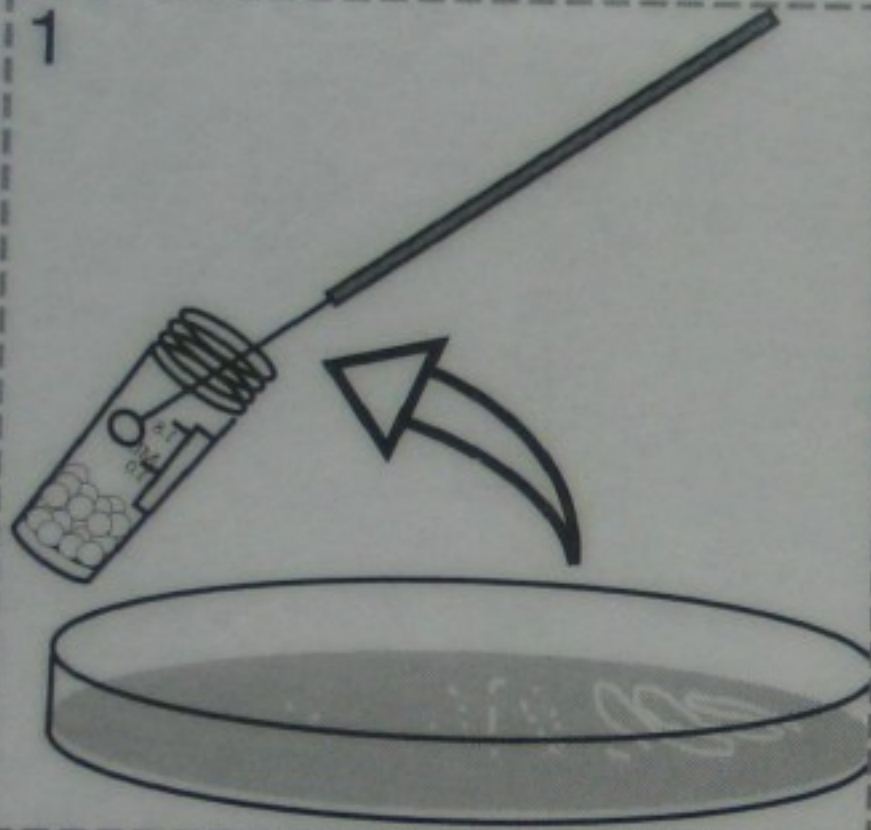
- 冷冻真空干燥是最好的保存方法，但不易做到。
- 平皿传代是较简单且实用的方法。将需要保存的菌株接种于布氏血琼脂平板上，放入厌氧罐（或袋）中于孵箱中培养**48**小时后，放室温阴凉处可保存两个月。





Microbank™

1



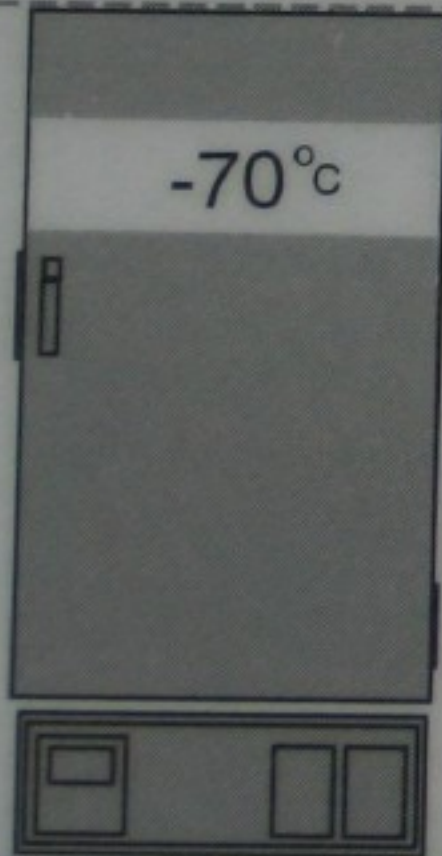
2



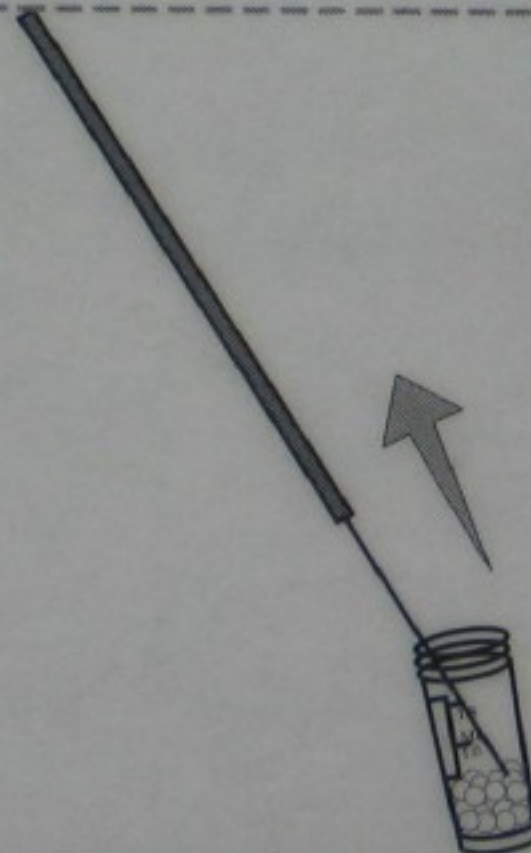
3



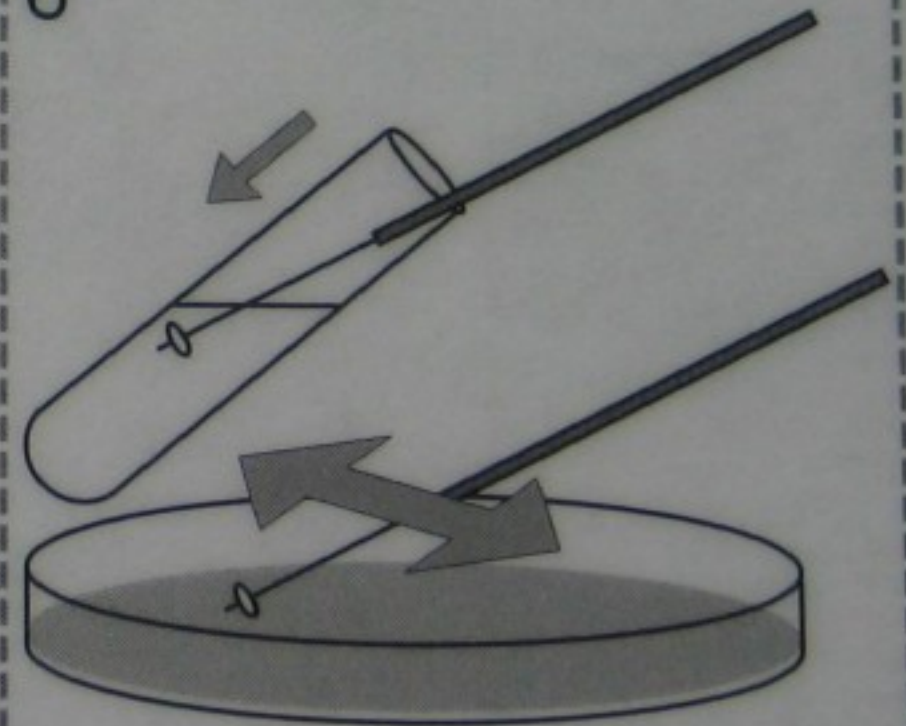
4



5



6



i



OXOID

LP0031

SKIM MILK POWDER

(VVD)

Net weight 500g (17.64oz)
Total nitrogen 8.3% (w/w)
Total moisture 5.0% (w/w)

2003/03
500g (17.64oz)
500g (17.64oz)

OXOID LTD, HAMPSHIRE, ENGLAND

膜脂奶粉

29/10

En 10% blanding i destillerat vatten kan brytas och passande i stället för flytande skummjölk till steriliseras i autoklav i 5 minuter vid 121°C.

En 10-procentig blandning i destillerat vatten kan användas som skummjölk i vätskeform, och kan steriliseras genom autoklavering i 5 minuter vid en temperatur på 121°C.

Uma mistura a 10% em água destilada pode ser usada imediatamente em vez de leite desnatado líquido e pode ser esterilizada por autoclavagem durante 5 minutos a 121°C.

Una mezcla al 10% de agua destilada puede usarse inmediatamente en vez de leche desnatada líquida y puede ser esterilizada por autoclavación durante 5 minutos a 121°C.

無菌水の10% 濃度は、膜脂の濃度を10%に調整して使用することができ、121°Cで5分間オートクレーブ処理が可能です。

CE









164

ULTRA LOW

-84

SANYO

VIP series -86°C

CFC FREE

4. 细菌耐药质粒的保存：

- 为了防止细菌耐药质粒的丢失，应尽量减少菌种的传代次数，最好与低温冰箱中保存。在转种带有耐药质粒的细菌时，应选用含有一定量的相应（耐药）抗生素琼脂平板，进行菌种传代。

谢谢!!!

